

сарколеммой эндотелиоцитов и ГМК, что приводило к изменениям её структуры и освобождения NO из сарколеммальных депо. Значительное и дозозависимое угнетение модулирующего действия монооксида азота на реакции СР на электрическую стимуляцию в случае длительной перфузии с Ан может быть обусловлено той же причиной - структурной перестройкой сарколеммальной мембраны под влиянием длительной перфузии с Ан.

#### *Литература*

1. Жукова А.В. Дослідження впливу ендотеліальних факторів на скорочувальну активність артеріальних і венозних судин. // Буковинський медичний вісник.- 1998.- 2, № 2.- С. 26-31.
2. Жукова А.В. Модулюючий вплив монооксиду азоту на реактивність міокарду та артеріальних судинних смужок. // Експериментальна і клінічна фізіологія.- 1999.- № 2.- С.51-56.
3. Ignarro L.J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide.//Annu.Rev. Pharmacol. Toxicol.-1990.- №30.-С. 535-560.
4. Raynal P., Pollard H.B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. // BBA.- 1994.- 1197.- P63-93.

### **РОЛЬ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В РЕАКЦИЯХ НИТРОЗИЛИРОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ БЕЛКОВ**

**Степура И.И., Адамчук Р.И., Коновалова Н.В.**

*Институт биохимии НАН Беларуси, г. Гродно*

Оксид азота и его метаболиты очень эффективно реагируют с различными молекулами, такими как, ферро- и ферри-формы железа, как в составе гема, так и в свободном состоянии [1], с супероксидом, молекулярным кислородом [2], глутатионом, цистеином, цистеиновыми остатками в белках [3].

Высокая реакционность оксида азота обуславливает его короткое время жизни (несколько секунд) в организме S-нитрозотиолы, напротив, значительно более стабильные соединения при физиологических условиях. Время полупревращения, например, S-нитрозоглутатиона (GSNO) или S-нитрозоальбумина более 10 часов, а S-нитрозоцистеина более 90 мин.

В плазме крови содержатся микромолярные концентрации GSNO и S-нитрозоальбумина. Освобождение NO из состава S-нитрозотиолов

возрастает в присутствии GSH, цистеина и особенно эффективно наблюдается распад S-нитрозотиолов под действием аскорбиновой кислоты ( $\text{AKH}_2$ ) [4]. Предполагается, что реакции взаимодействия между S-нитрозотиолами и  $\text{AKH}_2$  играют важную роль в регуляции функций NO в организме. На воздухе под действием  $\text{AKH}_2$  GSNO восстанавливается до GSH, и до 80% NO, содержащегося в составе GSNO, превращается в нитрит и нитрат. Причём, в данной реакции образуется подавляющее количество нитрита [4]. В данной работе мы исследовали взаимодействие гемоглобина (Hb), сывороточного альбумина человека и ряда аминокислот с  $\text{NO}_2^-$  в аэробных и в анаэробных условиях в кислой среде.

#### *Материалы и методы исследования*

Количество NO, выделяющееся при распаде S-нитрозосоединений (GSNO, S-нитрозоHb), контролировали по образованию нитрозоHb спектрофотометрическим, а также флуоресцентным методом по тушению пирена [5]. Количество сульфгидрильных групп определяли с помощью реактива Эллмана. Концентрацию нитрита измеряли с помощью реактива Грисса, регистрируя поглощение при 520 нм. Концентрацию нитратов измеряли также с помощью реактива Грисса, но после предварительной инкубации нитратов с пластинками металлического кадмия [4]. Процесс модификации индольных остатков апоHb нитритом контролировали флуоресцентным методом ( $\lambda_{\text{воз}}=296$  нм,  $\lambda_{\text{фл}}=350$  нм).

### **ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ НИТРОЗИЛИРОВАНИЯ ТИОЛОВ И ОБРАЗОВАНИЯ НИТРОЗОСОЕДИНЕНИЙ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ**

Как известно, глутатион в кислой среде реагирует с нитритом с образованием GSNO [4]. По мере увеличения в реакционной смеси содержания  $\text{AKH}_2$  снижалось образование GSNO и возрастало содержание SH-групп. Реакцию проводили в атмосфере воздуха. При достаточно высоких концентрациях  $\text{AKH}_2$  образования GSNO вообще не наблюдали (рис. 1).

Количество сульфгидрильных групп в этом случае совпадало с количеством сульфгидрильных групп до добавления нитрита. Протекание реакции S-нитрозилирования не зависит от растворенного кислорода. Действительно, в анаэробных условиях также наблюдали ингибирование образования GSNO  $\text{AKH}_2$ . Этот процесс сопровождался выделением NO. Количество выделившегося NO, регистрируемое по тушению флуоресценции пирена, хорошо совпадало с уменьшением концентрации  $\text{NO}_2$ .

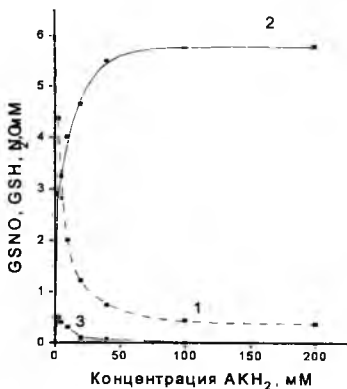


Рис. 1. Образование GSNO (1) и содержание GSH (2) и нитрита (3) при различных концентрациях  $\text{AKH}_2$  в смеси  $\text{GSH-AKH}_2\text{-NO}_2$ . Исходные концентрации GSH и нитрита  $6 \cdot 10^{-3}$  М.  $\text{AKH}_2$  смешивали с GSH и к полученной смеси добавляли нитрит. Измерения проводили после 60 мин инкубации смеси.

Если в экспериментах использовали высокие концентрации  $\text{AKH}_2$  (0.1 мМ и выше), то вообще, как и в атмосфере воздуха, не наблюдали нитрозилирования глутатиона, так как ионы нитрозония ( $\text{NO}^+$ ) восстанавливались до NO. В этих условиях наблюдали наибольший выход NO.

При максимальном выходе NO наблюдали полное расходование нитрита. Определение концентрации NO по образованию нитрозоHb дало сходные результаты. В отсутствие аскорбиновой кислоты выделения NO в кислой среде при смешивании эквимоларных концентраций нитрита и GSH не происходило. В этих условиях весь глутатион нитрозилировался. Мы предполагаем, что  $\text{AKH}_2$  в водных растворах в анаэробных условиях восстанавливает ион нитрозония в оксид азота, что и снижает выход GSNO. Аналогично протекают реакции нитрозилирования пролина или других вторичных аминов ионом нитрозония.  $\text{AKH}_2$  практически полностью блокирует образование N-нитрозосоединений. В атмосфере воздуха в водных растворах мы не заметили значительных различий в протекании реакций нитрозилирования по сравнению с анаэробными условиями. Мы показали, что в кислой среде весьма эффективно нитрозилируются сульфгидрильные группы молекулы Hb, индольные остатки Hb и сывороточного альбумина человека. Нитрозилирование сульфгидрильных групп возрастает в случае апоHb, и снижается в случае ферро-форм гемоглобина.

#### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ С НИТРОЗОГЛУТАТИОНОМ И НИТРИТОМ В АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ И В АТМОСФЕРЕ ВОЗДУХА

$\text{AKH}_2$  ускоряет высвобождение NO из состава GSNO при увеличении pH среды. В нейтральной и щелочной средах происходит очень быстрое разрушение молекулы GSNO с образованием GSH и NO. В ки-

слой среде  $\text{AKH}_2$  не только не ускоряет разрушение GSNO, но наблюдается даже стабилизация GSNO. Отдельно взятый GSNO, в отсутствие  $\text{AKH}_2$ , напротив, имеет большую стабильность в нейтральной и щелочной средах. Например, мы не наблюдали заметного распада GSNO при pH 7.0 в воде или фосфатном буфере в течение 7-дней при температуре  $5^\circ\text{C}$ .  $\text{AKH}_2$  в кислой среде восстанавливает нитрит до NO. В анаэробных условиях молекула  $\text{AKH}_2$  восстанавливает две молекулы нитрита до оксида азота. В атмосфере воздуха при нормальных условиях в кислой среде нитрит практически полностью трансформировался в нитрат.

Как показали экспериментальные и клинические исследования, токсическое действие нитратов и нитритов приводит к развитию гипоксии за счет образования метHb, нарушению транспорта электронов по дыхательной цепи митохондрий, нарушению окислительного фосфорилирования и, как следствие, блокировке активности ферментных систем клеток. Особенно опасна способность нитратов восстанавливаться до нитритов в организме. Нитриты вследствие взаимодействия в желудке с аминами могут образовывать канцерогенные N-нитрозосоединения [6]. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли  $\text{AKH}_2$  в обмене оксида азота, в первую очередь, в водных средах. Как известно,  $\text{NO}^+$  является сильным нитрозилирующим агентом и может нитрозировать в кислой среде сульфгидрильные группы и вторичные амины, например, в составе белков, с образованием S-нитрозотиолов и N-нитрилов. В водных средах  $\text{AKH}_2$  восстанавливает ион нитрозония до оксида азота.  $\text{AKH}_2$  будет препятствовать образованию токсичных соединений, например, N-нитрозоаминов, в кислой среде, в желудке, при попадании с пищей нитритов. Представленные экспериментальные данные свидетельствуют, что в кислой среде  $\text{AKH}_2$  не разрушает S-нитрозосоединения. Суммируя полученные результаты, можно заключить, что  $\text{AKH}_2$  восстанавливает GSNO в нейтральной среде до GSH и NO, а в кислой среде в атмосфере воздуха трансформирует  $\text{NO}_2^-$  до  $\text{NO}_3^-$ . В то же время,  $\text{AKH}_2$  снижает депонирование оксида азота, препятствует образованию S-нитрозосоединений. Последнее заключение касается водных растворов.

#### *Литература*

1. Lancaster, J.R., Hibbits, J.B. // Proc.Natl.Acad.Sci. USA. – 1990. V.87. –P.1223-1227.
2. Ingarro, L.J., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – V.90. – P. 8103-8107.
3. Beckman, J. S., Beckman T. W., Chen, J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – V. 87. – P.1620-1624.
4. Kashiba-Iwatsuki, M., Kitoh, K., Yu, H., Nisikawa, M., Matsuo, M., Inoe, M. // J. Biochem. – 1997. – V.122.- P. 1208-1214.

5. Степура И. И. , Адамчук Р. И. , Пилетская Т. П., Степура В. И., Маскевич С. А. // Биохимия. – 2000. - т. 65. -С. 1645-1658.
6. Helser M.A., Hotchkins J.H. //J. Agricult. Food Chem.- 1994.- V.42.- P.129-133.

## СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ СОСУДИСТЫХ ГЛАДКИХ МЫШЦ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ: РОЛЬ ЭНДОТЕЛИНА

Ткаченко М.Н., Сагач В.Ф.

*Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев*

Важную роль в возникновении артериальной гипертензии играют не только функциональные особенности мышечных элементов сосудистой стенки, но и состояние внутреннего слоя сосудов – эндотелия [2, 3, 4]. При артериальной гипертензии, как и при других патологических состояниях (атеросклероз, ишемия, реперфузионные повреждения, тромбоз, сахарный диабет, радиационное воздействие и др.), отмечается утрата адекватного контроля за величиной сосудистого тонуса и изменение содержания вазоактивных веществ эндотелиального происхождения. При гипертензии может повреждаться эндотелий сосудов. Это возможно при действии механических факторов, таких как повышение перфузионного давления, растяжения сосудистой стенки, увеличения напряжения сдвига [2, 5]. В последнее время интенсивно изучается роль в развитии артериальной гипертензии мощного вазоконстрикторного пептида эндотелина, синтезируемого эндотелием. Эндотелин может увеличивать сосудистый тонус посредством активации  $\text{Ca}^{2+}$ - каналов плазматической мембраны, мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо за счёт активации фосфолипазы C и образования инозитол-1,4,5-трифосфата, а также увеличения чувствительности сократительных белков к  $\text{Ca}^{2+}$  [1, 5, 7]. Известно, что уровень эндотелина у больных с гипертонической болезнью выше, чем у здоровых лиц [1, 3].

Цель работы состояла в исследовании участия эндотелина в сократительных ответах сосудистых гладких мышц (СГМ) гипертензивных крыс при их растяжении.

### *Материалы и методы исследования*

Исследования выполнены на изолированных препаратах воротной вены и грудного отдела аорты 6-8-месячных крыс линии Вистар-Киото (контрольная группа) и линии Окамото-Аоки с врождённой артериальной гипертензией. Проведено три серии экспериментов. В I серии изу-